

Zymomonas 屬 細菌을

利用한 酒精醱酵

李 啓 準

(서울大學校 自然科學大學
微生物學科 教授·理博)

目 次

I. 序 論

II. 酵母菌을 利用한 高生産性 Ethanol 醱酵

1. 高生産性 Ethanol 醱酵을 위
한 酵母菌의 長·短點
2. 酵母菌의 菌株改良 現況
3. 高生産性 Ethanol 醱酵 System

III. Zymomonas 속 세균의 Ethanol 醱酵特性

1. Ethanol을 醱酵 生産하는 細菌
2. Zymomonas 속 세균의 생물학
적 특성

IV. Zymomonas mobilis 를 이용한 高 生産性 Ethanol 醱酵

V. Zymomonas 와 Yeast 와의 比較

VI. 結論 및 將來性

I. 序 論

人類의 역사와 함께 시작되었다고 하는 술(酒)의 기원은 各種의 酵母菌에 의하여 醱酵되는 것으로 인식되고 있다.

수천년의 오랜 시간을 지내면서 각양각색의 술이 개발되었지만 모든 연구의 목표는 고유한 향취와 색상 등의 기호성에 집중되었다 할 수 있다.

1970년대에 세계적으로 문제가 되었던 "오일 쇼크"는 이제까지 의존해온 석유대신 대체액체연료의 개발의 필요성을 인식하게 했다. 이에 부응하여 농산물이 잉여되는 국가를 중심으로 전분(澱粉) 또는 당(糖)으로부터 酒精을 醱酵法으로 생산하는 方法의 개선에 관한 연구가 활발해졌다.

즉 기호성 증진에 주안되었던 종래의 경향과는 달리 원료로부터 산물인 주정을 얻는 균주와 方法을 개선 내지는 고안하여 ethanol 生産 取率을 증진시키며 또한 醱酵完了後 ethanol의 농도를 높여서 ethanol을 회수하는 증류과정에서 열소모를 감소시켜 결과적으로 ethanol 生産단가를 낮추려는 것이다.

본 論文의 제목인 Zymomonas 속세균에 의한 ethanol 발효도 이러한 연구경향에 의하여 이루어진 것이므로 우선 종래에 사용하였던 酵母에 의한 ethanol 醱酵法을 정리하고 다음 Zymomonas에 의한 醱酵法을 소개하여 그 특성을 정리하며 결론적으로 兩 醱酵法을 比較考察하고자 한다.

II. 酵母菌을 이용한 高生産性 Ethanol 醱酵

1. 高生産性 Ethanol 醱酵을 위한 酵母菌의 長·短點

數千年동안 쓰여온 효모균은 그나름대로 Ethanol 醱酵에 아주 적절한 특성을 가지고 있다. 특히 高生産性 ethanol 醱酵을 위하여 바람직한 특성으로는

- (1) 高濃度の 基質을 발효할 수 있다.
- (2) 高濃度の 基質溶液에서 成長速度가 빠르다.
- (3) 醱酵後 溶液内 ethanol 生産收率이 높아서 理論值의 80~95%까지 이른다.
- (5) 基質로 이용할 수 있는 糖의 범위가 넓어서 glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose 등의 糖은 물론 경우에 따라서는 澱粉에 이르기 까지 그 범위가 넓다.
- (6) 증식된 菌體의 영양학적 또는 독성학적 연구가 완료되어 발효후의 菌體는 동물사료등에 이용할 영역이 확보되어 있다.

이러한 特性을 지닌 酵母菌을 利用하여 高生産性 ethanol을 醱酵할 때 그 生産性을 높일 때 그 生理, 生態的 特性으로 인해서 한계점이 있다. 이러한 特性을 요약하면,

- (1) 基質阻害(Substrate Inhibition) : 발효初 용액내 당의 농도가 높으면 菌의 成長과 Ethanol 醱酵가 阻害 받는다.
- (2) Ethanol 阻害(Ethanol Inhibition) : 醱産物인 ethanol의 농도가 증가할수록 菌의 성장 및 ethanol 醱酵가 阻害를 받는다.

이상 기질 및 ethanol 阻害作用은 回分醱酵時에 더욱 명백하며 서로 긴밀한 연관을 갖고 있다. 보통 *Saccharomyces cerevisiae* 균의 경우 기질로 당의 농도 200g/l로 사용하였을 때 최종 ethanol 농도는 80~90g/l가 된다.

만약 균주를 개선하여 당의 농도 200g/l을 훨씬 초과해서 250g/l 또는 300g/l 당을 완전히 발효하여 ethanol 최종농도를 120~140g/l까지 이를 수 있다면 그 생산성 및 회수 공정에서 얻을 수 있는 생산비 절감효과는 대단한 것으로 인정된다.

Ethanol inhibition은 substrate inhibition보다 더 심각하여 통상 최후 ethanol 농도가 120g/l 이상(30°C에서 발효할 경우)을 올리는 매우 어려운 상태이다. 특히 ethanol 농도가 증가되는 발효후기에서 ethanol 생성 속도는 심각하게 저하되어 발효시간 연장에 따른 ethanol 증가 정도가 낮은 편이다. 이러한 ethanol inhibition 현상은 발효온도와도 밀접한 관계가 있다. 즉 온도가 상승하면 어느정도(대략 37°C)까지는 발효속도가 증가되기는 하나 최종 ethanol 농도가 현저히 감소된다. 이러한 현상은 균의 生存率이 ethanol 농도와 발효온도와 밀접한 연관이 있기 때문이다. 日本 清酒의 발효에서 ethanol 농도 20%(V/V) 즉 160g/l 까지 올릴 수 있는 것은 後醱酵의 온도를 10~15°C로 내려서 菌의 生存을 유지시켜 주기 때문이다.

Ethanol inhibition을 설명하기 위한 여러가지 이론이 실험적으로 설명되고 있는데 그 중 가장 명백한 것들은 발효중 菌體内的 ethanol 농도가 급격히 증가되어 미처 菌體外로 排出되지 못해 菌體内에 蓄積되어 醱酵에 필요한 酵素에 feed-back inhibition 시키든가(Nagodawithana 1977) enzyme의 酵素的作用을 物理的으로 活시키든가 또는 菌體의 membrane의 排出能力(permeability)을 變化시키는 것

(Navarro and Durand1978)들을 들 수 있다.

이러한 ethanol inhibition 또는 substrate inhibition을 改善하는 것이 高生産性 Ethanol 醱酵의 중요한 문제이다. ethanol 발효에서 많이 쓰이고 있는 菌株 즉 *Saccharomyces cere-*

visiae, *Saccharomyces uvarum* 등의 발효 kinetics를 조사하면 표 1에서 보는 바 같이 사용한 기질의 농도가 높으면 즉 생산된 ethanol의 농도가 높으면 균체의 증식속도(μ) 및 ethanol 생산속도(q_p)가 줄어들음을 알 수 있다.

Table 1. Kinetic parameters for various strains of yeasts used for ethanol fermentation.

Microorganism	Culture System	Glucose input (g/l)	Kinetic parameters at optimal condition					Reference
			μ (h^{-1})	q_p (g/g/h)	q_s (g/g/h)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 4126	Continuous Culture	100	0.58	0.58	1.41	0.41	0.21	Cysewski and Wilke (1976)
	Continuous Culture	89	0.19	0.60	1.39	0.43	0.13	
	Continuous Cell Recycle	100	-	0.58	1.32	0.44	-	Cysewski and Wilke (1977)
<i>S. cerevisiae</i> NRRL - Y132	Continuous Culture	100	0.12	0.61	1.38	0.44	0.08	Tyagi and Ghose (1980)
	Continuous Culture	220	0.12	0.62	1.32	0.47	0.09	
	Continuous Cell Recycle	100	-	0.67	-	-	-	Ghose and Tyagi (1979a)
<i>S. uvarum</i> ATCC 26602	Batch	250	0.23*	1.15*	3.05*	0.38	-	Lee <i>et al.</i> (1980)
	Continuous Cell Recycle	200	-	0.75	1.67	0.43	-	del Rosario <i>et al.</i> (1979)

* Parameters were estimated by computer simulation where no ethanol inhibition occurred

μ : specific growth rate (h^{-1})

q_p : specific rate of ethanol production (g/g/h)

q_s : specific rate of sugar uptake (g/g/h)

$Y_{p/s}$: ethanol yield (g/g)

$Y_{x/s}$: biomass yield (g/g)

2. 酵母菌의 菌株改良 現況

발효 ethanol의 기호성을 고려하지 않고 단지 생산성만을 목적으로 하여 새로운 菌株가 개발되었는데 그 유형별로 요약하면 다음과 같다.

(1) 高濃度의 基質(糖) 및 ethanol의 耐性 菌株의 개발 : Rose (1976) 등은 250g/l의 당농도

에서도 성장과 ethanol 발효속도가 저해되지 않는 *Saccharomyces uvarum*을 糖蜜에서 분리 취득하여 발효 Ethanol 최종농도가 106~113 g/l 까지 가능하였다.

(2) 凝集性 菌株의 개발 : 酵母가 凝集性을 갖게 되면 醱酵槽下部로 침강되어 소위 下面醱酵가 가능하게 된다. 이 균주를 tower ferme-

ntor에서 연속배양하면 internal feed-back 이 되어 基質阻害, ethanol阻害등이 감소되며, ethanol생산성을 증진시킬 수 있다(Hough and Button, 1972).

(3) 高温性菌株의 開發: 할 수만 있다면 高温에서 醱酵하면 생산된 ethanol의 회수에서도 유리할 뿐 아니라 전분등을 糖化시키는 最適溫度가 醱酵溫度보다는 높으므로 糖化後 온도를 낮추는데 필요한 비용을 감소시킬 수 있다. 또한 醱酵熱의 冷却에 필요한 비용을 감소시킬 수 있으므로 高温性菌의 利點이 많다.

이러한 연구의 일환으로 40~45°C에서도 醱酵가 가능한 菌株가 개발되었다(Navarro and Durand, 1978).

(4) 生理的 欣陷菌株의 開發: 酵母의 respiratory chain에 결함을 유도하여 respiratory deficient mutant (petites)을 사용하면 사용하는 糖이 菌体로 전환되는 것이 最少化 되고 모두 ethanol생산하는데 쓰이게 된다. Bacila 등은 이러한 균주를 얻어 사용한 결과 母菌보다 ethanol收率이 2배 증가되었음을 보고하였다(Bacila and Horii, 1979). 그러나 이러한

Table 2. Comparison of various fermentation systems with yeasts for ethanol production.

System used	Strain used	Conc ⁿ of glucose (g/l)	Conc ⁿ of cell (g/l)	Conc ⁿ of ethanol (g/l)	Retention time (h)	Productivity (g/l/h)	Reference
Batch	<i>S. cerevisiae</i>	25° Brix	8 × 10 ⁸ (cell/ml)	95	3	31.6	Nagodawithana <i>et al.</i> (1976)
	"	220	26	95	4.5	21.6	Ghose and Tyagi (1979a)
Fed batch	<i>S. uvarum</i>	160-360	83	75	5.0	25.0	del Rosario <i>et al.</i> (1979)
Continuous	<i>S. cerevisiae</i>	89	12.5	41	5.9	7.0	Cysewski and Wilke (1977)
	"	160	3.9	33	8.0	4.1	Ghose and Tyagi (1979a)
Immobilized cell	<i>S. cerevisiae</i>	175	-	70	4.5	15.6	Linko and Linko (1981)
	"	250	-	114	2.6	32.6	Wada <i>et al.</i> (1981)
Cell recycle	<i>S. cerevisiae</i>	150	50.0	46	1.58	29.0	Cysewski and Wilke (1977)
	<i>S. uvarum</i>	200	48.0	60	1.66	36.0	del Rosario <i>et al.</i> (1979)
Vacuum recycle	<i>S. cerevisiae</i>	334	124.0	100-160*	-	82.0	Cysewski and Wilke (1977)
no recycle			50.0		-	40.0	

* ethanol concentration in the condensate of vapour stream.

균주는 발효시간이 길어지고 균체의 생존율이 현저히 감소되는 것이 큰 문제점으로 대두되었다.

이러한 균주의 개량에 관한 연구가 다방면으로 수행되었으나 目的한 ethanol의 耐性菌株의 개발은 아주 뛰어난 결과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 따라서 균주개량以外 발효장치 및 발효조건의 개선이 필요하다.

3. 高生産 Ethanol 醱酵 System

기존의 酵母이진 또는 개발한 우수한 酵母를 사용하든 醱酵條件을 개선하든가 장치를 개선하면 문제시된 ethanol阻害作用을 경감시켜 高生産 ethanol醱酵가 가능하다. 이러한 目的으로 개발된 醱酵 system과 그때 얻어진 결과를 정리하면 표 1과 같다.

III. *Zymomonas* 속 세균의 ethanol 醱酵特性

1. Ethanol을 醱酵 生産하는 細菌

종래까지 ethanol醱酵하면 관습적으로 酵母에 의한 것으로 생각되어왔다. 그러나 飲用이 아닌 ethanol을 생산함에 있어서 酵母以外的 菌으로 ethanol생산을 시도하게 되었다. 즉 酵母菌以外 ethanol 생산하는 菌株의 종류와 이 菌株가 이용하는 基質을 정리하면 table 3과 같다. 이들 각 균주는 基質을 分解해서 ethanol과 CO₂ 기타 酸 또는 acetone을 생성하는 과정이 일정하지 않다.

이 중에서도 최근에 연구의 집중이 되고 있고 또 기대해 볼 만한 전망을 가진 것으로는 *Zymomonas*속 세균과, 혐기적발효 조건에서 섬유소를 직접 ethanol, acetone 또는 butanol을 생성하는 *Clostridium*속 세균이라 할 수 있

Table 3. Microorganisms producing ethanol from various substrates

Microorganism	Substrate	Main end products
<i>Zymomonas mobilis</i>	Hexoses	Ethanol, CO ₂
<i>Ruminococcus albus</i>	Cellulose Hemicellulose	Ethanol, CO ₂ acetic acid
<i>Clostridium thermocellum</i>	Cellulose Simple Sugars	Ethanol, CO ₂ acetic and lactic acids
<i>Clostridium Thermosaccharolyticum</i>	Hemicellulose Pentoses	Ethanol, CO ₂ acetic/lactic acid
<i>Bacillus macerans</i>	Starch Sugars	Ethanol, CO ₂ acetone
<i>Erwinia amylovora</i>	Sugars	Ethanol, CO ₂ lactic acid
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Pentoses	Ethanol, CO ₂ lactic acid
<i>Sarcina ventriculi</i>	Hexoses	Ethanol, CO ₂ acids

다. 본 논문은 *Zymomonas*속 세균의 ethanol 발효특성을 검토하고자 한다.

2. *Zymomonas* 속 세균의 생물학적 특성.

*Zymomonas*속 세균은 본래 열대성 지방의 agave 樹液을 발효시킨 pulque라는 술에서 최초로 발견되었다(Lindner 1928). 그후 변패된 cider 및 맥주등에서 발견되었는데 열대지방의 palm juice을 발효시켜 palm wine을 만드는 菌으로서 밝혀졌다. 그후 이 세균은 Cider나 맥주의 맛을 가지게 하는 汚染菌으로서 이의 제거에 하는 일이 큰 골치거리였다(Barker, 1948, Millis 1951, 1956), 이 균은 *Thermobacterium mobilis*라는 最初의 이름이 붙여진 以後 20여 다른 이름으로 명명되었으나 Ber-

gey's manual 제 7 판에 Van Niel에 의하여 *Zymomonas* 라고 정식으로 통일 명명되었다.

Bergey's manual 8 판에 *Zymomonas* 속 세

균은 *Zymomonas mobilis*와 *Zymomonas anaerobia*로 구분 명명되었는데 그 특성은 Table 4 와 같다.

Table 4. Original basis for classification of the two species of the genus *Zymomonas* (from Carr, 1974; and Carr and Passmore, 1971).

Characteristics	<i>Z. mobilis</i>	<i>Z. anaerobia</i>
Dimensions in microns	1.4-2.0×4.0-5.0	1.0-1.5×2.0-3.0
Occurrence	Fermenting plant juices	Tainted ciders, Perries and beers
Ability to effect sucrose fermentation	Ferments and produces levan	Does not ferment
Cytochromes in aerobically grown cells	a ₂ and c	b and c
in anaerobically grown cells	a ₂ , b and c	b and c
Requirements for lipoic acid and biotin	Not required	Essential

그러나 최근 이 두 균주를 DNA base 성분, DNA genome size, Protein Electrophoregrams 등 새로운 분류기법을 사용한 결과 이 두 균주의 차이가 없음을 보고 하였다. (Swings and Deley, 1977).

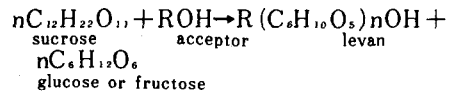
이 균주의 특징은 매우 빠른 운동성을 갖는 것으로서 Gram[⊖]의 단간균이다.

혐기적 배양조건에서 잘 자라나 산소가 존재하는 표면상에도 쉽게 집락을 형성한다. 이 속의 균은 glucose, fructose 및 sucrose 만을 기질로 이용하는 것이 특징으로서 그 대사과정도 Entner Doudoroff Pathway 로 쓰여진 당으로 부터 같은 mole 의 ethanol 과 CO₂ 을 생산한다. 이 때 관여하는 enzyme 과 총괄적인 질량평형은 figure 1 과 같다. 즉 酵母에서 일어나고 있는 glycolytic pathway 에서는 1 mole 의 Glucose 에서 2 mole 의 ATP 가 생성 되는데 비해 Entner Doudoroff Pathway 에서는 단지 1 mole 의 ATP 만이 생성된다.

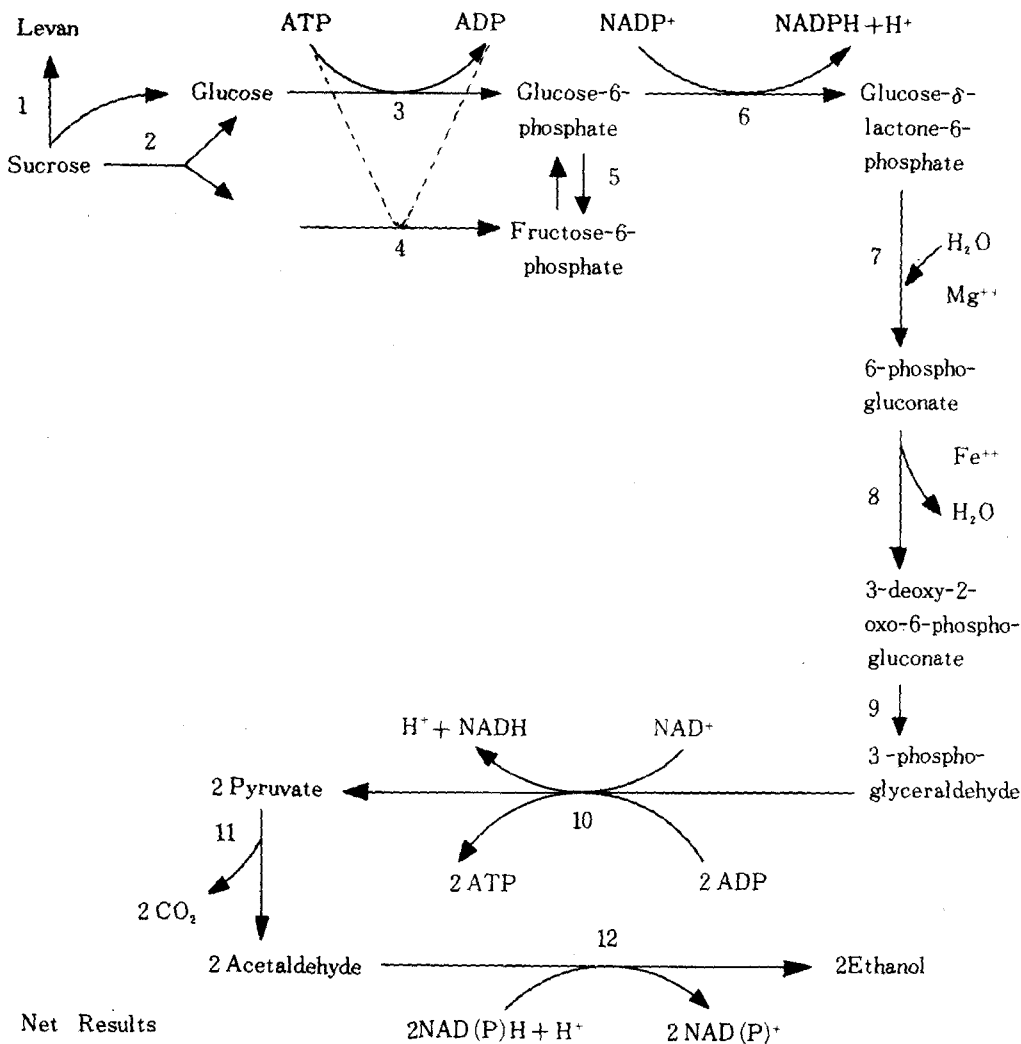
Fructose 에서는 glucose 에서 보다 etha-

nol 생성 수율이 떨어지며 균체의 증식도 느린 것으로 나타났다 (McGill *et al.*, 1965)

Sucrose 利用性은 *Zymomonas* 속 세균이라도 분리된 균주에 따라 각각 다른 것으로 나타났다. 대체로 Sucrose 을 이용하는 균주는 Fructose 의 고분자 물질인 levan 을 형성하는데 실제로 sucrose uptake 와 levan 의 형성되는 mechanism 이 밝혀져 있지 못하다. 다만 다음의 공식으로 levan 이 형성되며 sucrose 가 분해되어 glucose 와 fructose 로 되는 것으로 믿고 있다.



이상 sucrose, glucose, fructose 이외의 당은 利用하지 못한다. 기타 배지성분의 특이성으로는 pantothenate 영양요구성을 들 수 있다. ammonium salt 나 amino acids, peptides 을 질소원으로 이용하나 nitrate 나 nitrites 등을 利用 못한다 (Belaich *et al.*, 1972).



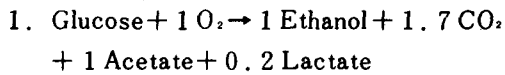
Enzymes Involved

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1; Levan - sucrose (proposed) | 7; Aldo - lactonase |
| 2; Invertase (proposed) | 8; 6 - P - gluconate - hydro - lyase |
| 3; Glucokinase | 9; Aldolase |
| 4; Fructokinase | 10; 3 - P - glyceral dehyde dehydrogenase |
| 5; Glucose - phosphate isomerase | 11; Pyruvate decarboxylase |
| 6; G - 6 - P dehydrogenase | 12; Alcohol dehydrogenase |

Figure 1. Mechanism of carbohydrate metabolism in *Z. mobilis* (modification of Entner - Doudoroff pathway).

이들 균주의 발효 최적온도는 25~31°C 이나 균주에 따라서는 37°C에서도 발효가 가능하다. 최적 pH는 5~7 이나 pH3.5에서도 균의 성장이 양호하다 (Swings, Deley 1977).

이 균은 anaerobic 상태에서 동mole의 ethanol과 CO₂를 생산하나 만약 통기를 시켜주면 Ethanol 생성량이 아주 적으며 나아가 균의 성장도 매우 느리거나, 증가 현상을 보기가 어렵다. 그렇다고 발효액중의 용존된 산소를 제거시킬 필요는 없다. 만약 O₂이 존재하면 다음 관계식에서 표시하듯이 Ethanol, CO₂와 Acetate 및 Lactate가 생성된다.



3. 醱酵 Kinetics 의 特性

가. 回分醱酵

*Zymomonas*속 세균을 총 수합하여 각 균주의 醱酵能力을 比較하였던 결과 Table 5에 나

타난 것과 같다. 즉 사용한 기질, glucose 및 sucrose에서 比增植速度와 ethanol생산 속도가 높은 菌株로는 균주번호 ZM4가 가장 우수함을 알 수 있다. 이 균주는 고농도의 molasses에서 분리한 것으로 운동성이 없는 것이 특징이다.

*Zymomonas mobilis*균주중 가장 우수한 菌株로 선별된 ZM4를 사용하여 좀더 정확한 fermentation kinetic parameters를 구하고저 glucose 농도를 100, 150, 200, 250, 300 g/l로 변화시킨 回分醱酵의 結果는 figure 2, 3 및 4와 같았다. 이상의 結果에서 본 것 같이 高濃度의 糖을 신속히 그리고 매우 효율적으로 ethanol을 생성함을 알 수 있었다. 이상의 실험실적 연구결과를 좀 더 數字的으로 比較하기 위하여 限定된 醱酵時間内 균의 fermentation kinetic parameters를 계산한 결과 table 6과 같았다. 즉 균의 比增植速度(μ)는 glucose 농도 증가에 따라 현저하게 영향을 받아 감소하는데 비해 比 ethanol 生成速度(q_p)

Table 5. Comparative data for evaluation of different strains of *Z. mobilis*.

Strain used	Specific growth rate at 100 g/l sugar (h ⁻¹)		Ethanol productivity on 100 g/l sugar (g/l/h)		Max. ethanol concentration from 200 g/l glucose (g/l)		
	glucose	sucrose	glucose	sucrose	30C	37C	42C
<i>Z. mobilis</i>							
ZMI (ATCC 10988)	0.22	0.20	1.28	1.16	60	40	0
ZM4 (CP4)	0.25	0.23	1.68	1.25	81	52	30
ZM6 (ATCC 29191)	0.29	0.22	1.04	1.46	77	0	0
Ag 11	0.24	0.19	1.30	1.20	55'	0	0
3 TH Delft	0.20	0.19	1.00	1.18	-	-	-
B 70	0.18	0.18	1.10	1.25	-	-	-
ZAbi	0.17	0.18	0.70	1.25	-	-	-
<i>Z. mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>							
ATCC 29192	0.22	0	1.55	0	-	-	-
238	0.16	0	0.64	0	-	-	-
S 30.2	0.17	0	1.51	0	-	-	-
S 30. A	0.16	0	1.33	0	-	-	-

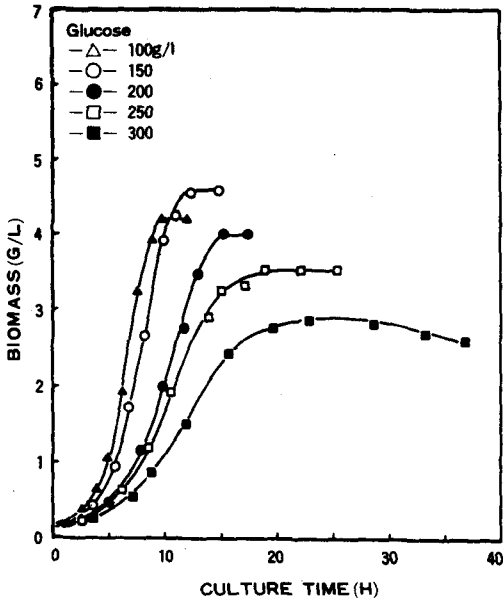


Figure 2. Effect of initial glucose concentration on biomass production for *Z. mobilis* ZM 4 (pH= 5.0, T=30°C).

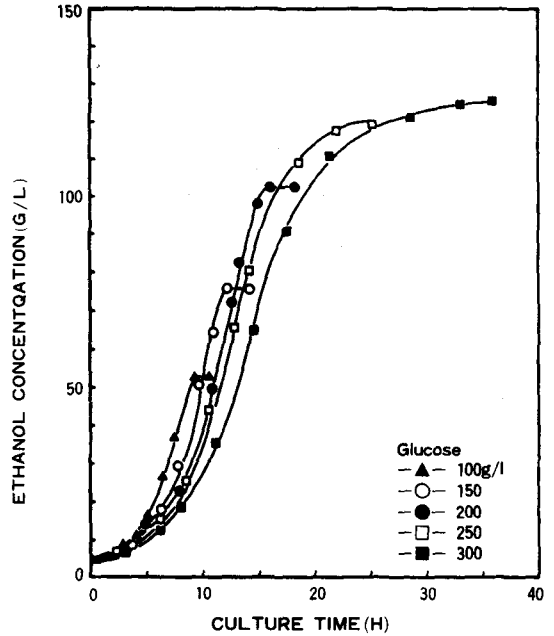


Figure 4. Effect of initial glucose concentration on ethanol production for *Z. mobilis* ZM4 (pH=5.0, T=30°C).

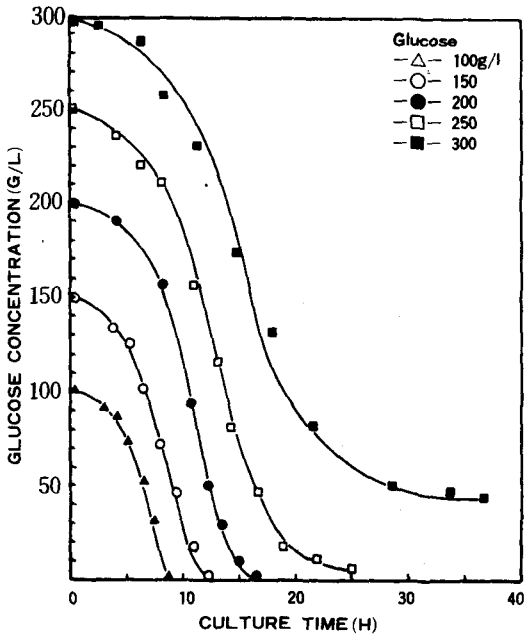


Figure 3. Effect of initial glucose concentration on glucose uptake for *Z. mobilis* ZM 4 (PH=5.0, T=30°C).

는 거의 영향을 받지 않고 일정한 값을 유지하고 있다. 또한 주목할 만한 사실은 基質로부터 ethanol 생성 取準이 매우 높아서 理論値의 92~96%에 이르고 있다. 반면 菌體 생성 수율은 1.5~3%여서 쓰여진 대부분의 기질은 目的하는 Ethanol로 전환되었다는 뜻이다.

나. 連續培養

좀 더 정확한 fermentation kinetic parameters를 구하기 위하여 glucose 농도 60g/l, 100g/l, 135g/l, 170g/l, 200g/l의 배지를 사용한 連續培養을 하였다. 그 중 100g/l, 170g/l, 200g/l, glucose 배지를 사용한 것을 도시하면 Figure 5, 6, 7 과 같았다.

Figure 5에서 볼 수 있는 것은 dilution rate $0.25h^{-1}$ 되기까지는 주어진 glucose가 완전히 ethanol로 발효되는 이른바 glucose limited chemostat의 현상이 뚜렷하였다. 이때까

Table 6. Kinetic parameters of *Z. mobilis* ZM 4 in batch culture at various glucose concentrations.

Kinetic parameters	Initial glucose concentration				
	100	150	200	250	300
Specific growth rate μ (h^{-1})	0.35	0.27	0.22	0.18	0.13
Specific ethanol productivity q_p (g/g/h)	5.2	4.2	5.1	5.4	4.3
Specific glucose uptake rate q_s (g/g/h)	10.9	8.9	10.5	11.3	8.7
Biomass yield $Y_{x/s}$ (g/g)	0.032	0.030	0.018	0.015	0.015
Ethanol yield $Y_{p/s}$ (g/g)	0.48	0.47	0.49	0.48	0.49
% of theoretical yield	94.0	92.0	96.0	94.0	96.0
Time period of calculation (h)	0-10	0-13.5	0-18.5	0-19	0-20

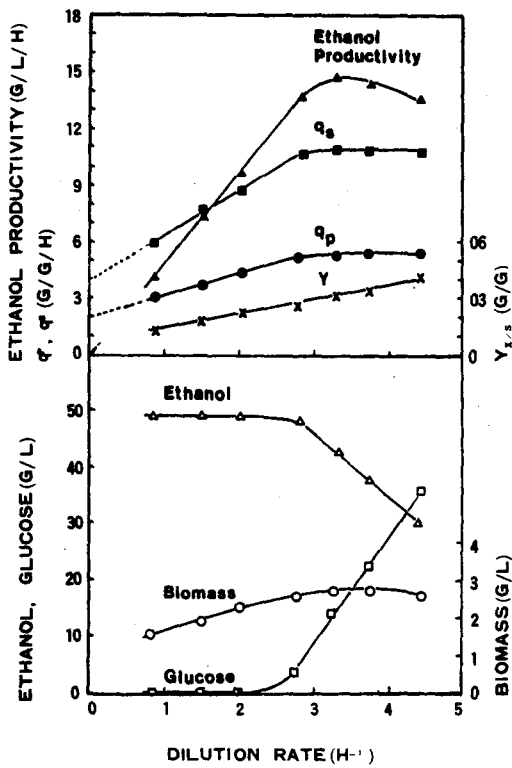


Figure 5. Steady state data and kinetic parameters for *Z. mobilis* ZM 4 with 100 g/l glucose medium (pH=5.0, T=30 °C).

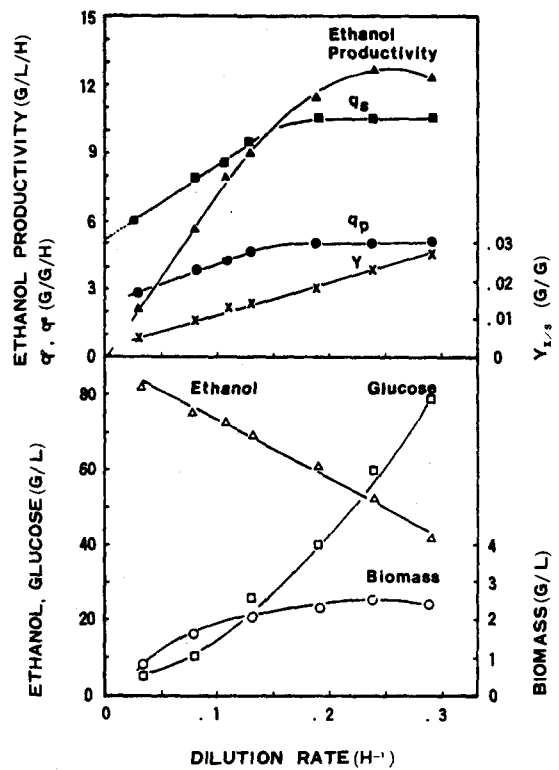


Figure 6. Steady state data and kinetic parameters for *Z. mobilis* ZM 4 with 170 g/l glucose medium (pH=5.0, T=30 °C).

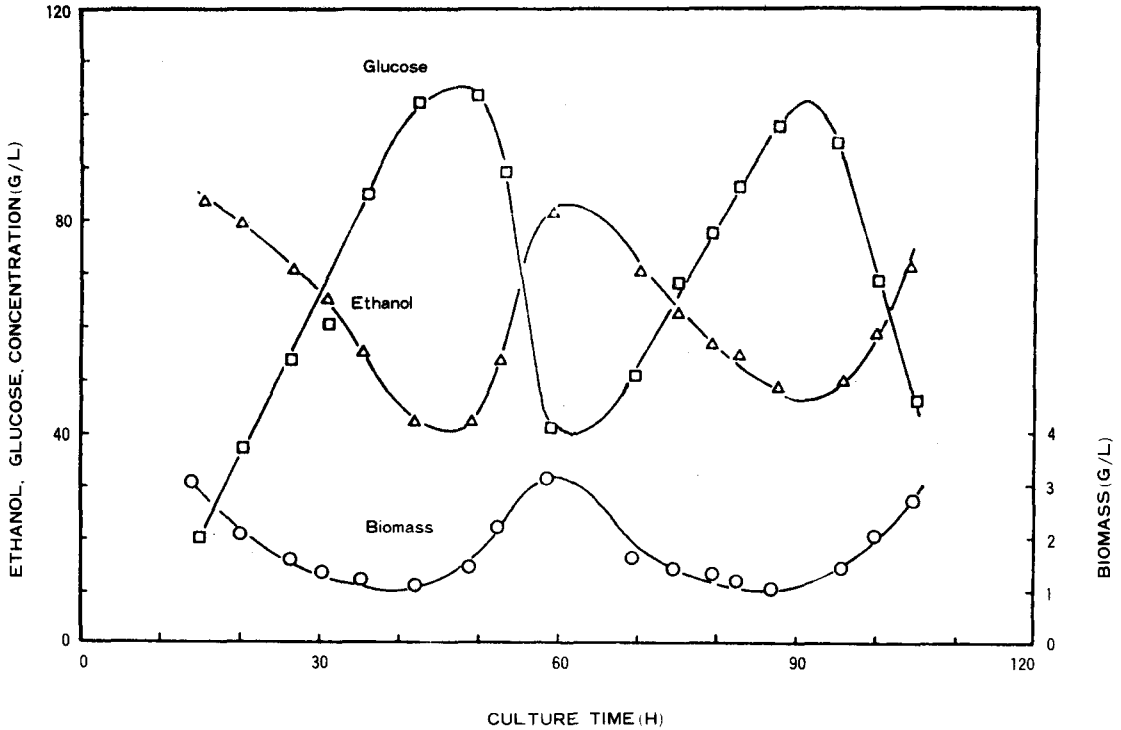


Figure 7. Oscillations in *Z. mobilis* ZM4 culture with 200g/l glucose medium, at dilution rate $D=0.1h$ ($pH=5.0$, $T=30^{\circ}C$).

지 比Ethanol生成速度(q_p)는 계속 증가하였다가 그 以後부터는 q_p 가 더이상 증가하지 않는 最上値를 보여주고 있다. 즉 주어진 glucose가 完全히 ethanol로 전환되지 못하고 outflow의 발효액에 잔류 glucose의 농도가 dilution rate가 증가 할 수록 증가되는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 ethanol-limited continuous culture라 할 수 있는데 이 현상은 figure 6에 더욱 확실하였다. 즉 ethanol 농도가 감소하는데 따라(gilution rate가 증가하는 것과 比例됨) glucose uptake 및 比ethanol生成速度 역시 증가하다가는 $q_p=10.5 g/g/h$ 되어서는 q_p 값이 일정한 것을 알 수 있었다.

이러한 glucose uptake (ethanol생성과 비례)와 균의 성장간에 不合一(Uncoupling)되는

것이 *Zymomonas* ethanol발효에서의 특징이라 할 수 있다.

Figure 7에서 보는 균체량, ethanol, glucose농도의 oscillation현상은, ethanol농도가 菌의 성장에 긴밀히 영향을 주는 것으로 판단된다. 즉 ethanol농도가 증가하면 菌의 比増植速度를 감소시켜서 결과적으로 발효조내의 균체량을 감소시키게 된다. 즉 균의 비증식속도가 dilution rate보다 낮다는 뜻이다. 따라서 ethanol생성속도가 낮으므로 ethanol 농도가 낮아지면 균의 증식속도가 빨라지게 된다. 즉 비증식속도가 dilution rate보다 빠르므로 균의 농도는 증가하게 되는 것이다.

이러한 현상을 종합적으로 정리하면 figure 8과 같다. 즉 ethanol농도가 증가하여도 ethanol농도 60~70g/l되기 전까지는 比etha-

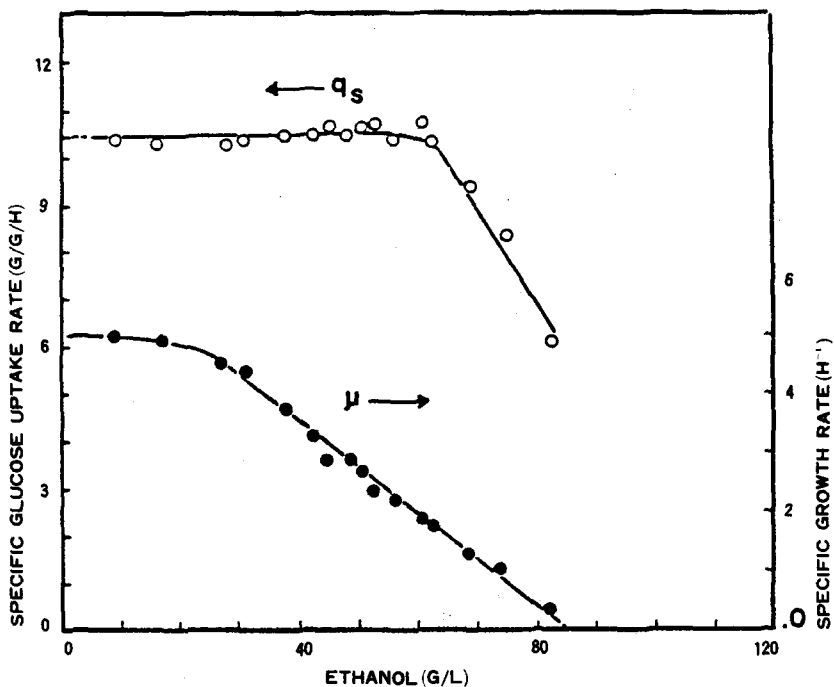


Figure 8. Effect of ethanol on the specific growth rate and glucose uptake of *Z. mobilis* ZM 4.

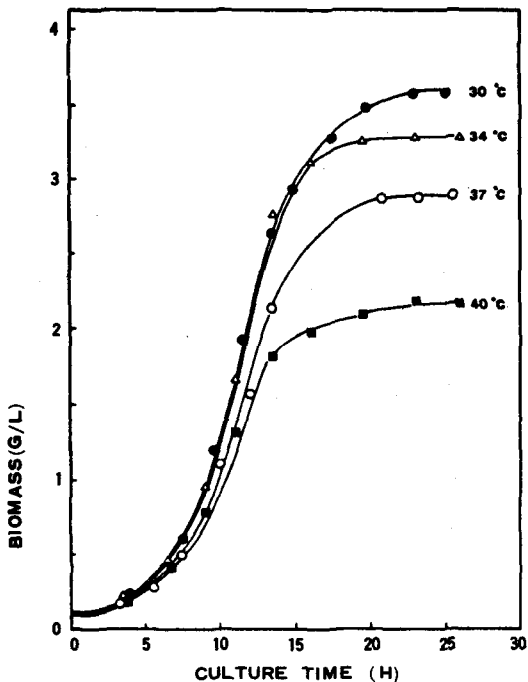


Figure 9. Effect of temperature on biomass production by *Z. mobilis* ZM 4 using 250 g/l glucose medium (pH=5.0).

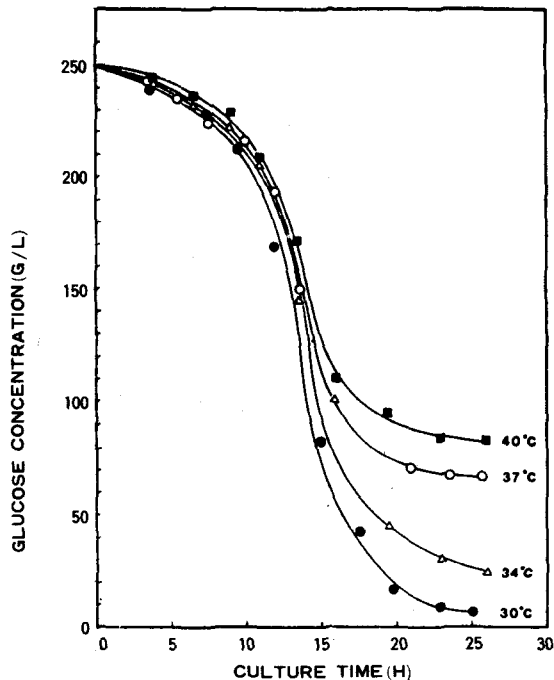


Figure 10. Effect of temperature on glucose uptake by *Z. mobilis* ZM4 using 250g/l glucose medium (pH=5.0)

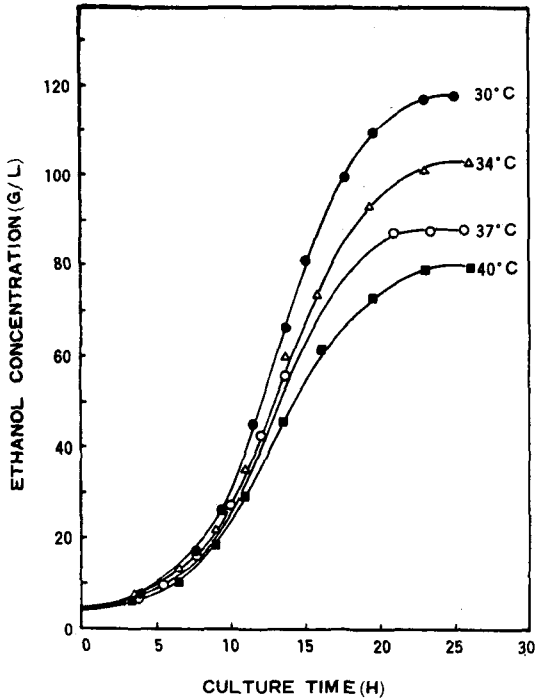


Figure 11. Effect of temperature on ethanol production by *Z. mobilis* ZM 4 using 250 g/l glucose medium. (pH=5.0).

nal 생성속도 (q_p)는 영향을 받지 않으나 菌의 비증식속도는 ethanol 농도의 증가와 직선적 감소를 받는 것이다. 이러한 anabolism과 catabolism의 uncoupling이 *Zymomonas*를 이용할 때 高生産成 醱酵가 가능하게 한다.

다. 醱酵溫도의 影響

Ethanol 발효를 최적화하기 위해서는 발효온도의 영향을 검토하여야 한다. 前述했듯이 가능하면 高溫이 바람직하므로 30~40°C 까지 온도를 변화시키며 250g/l의 glucose 배지를 사용한 biomass의 형성, glucose의 변화 및 ethanol 생성은 결과는 figure 9, 10, 11과 각각 같았다.

즉 발효온도를 30°C에서 부터 40°C까지 변화시킨 결과 생성되는 biomass의 농도가 정비

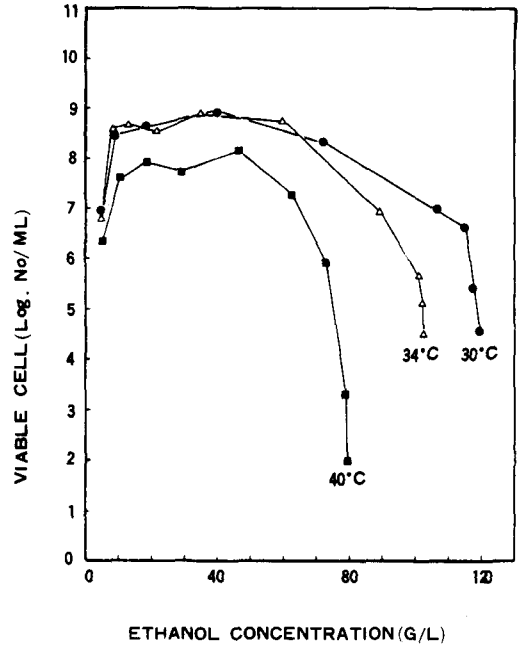


Figure 12. Effect of temperature on viable cell count for *Z. mobilis* ZM 4 (pH=5.0).

례로 감소하였으며 glucose의 uptake 및 ethanol 생산도 심각하게 영향을 받는 것을 알 수 있다. 특히 발효의 모든 결과라고 볼 수 있는 최종 ethanol의 농도가 온도가 상승할수록 급격히 감소됨을 알 수 있다. 이러한 결과를 이해하기 위하여 동실험중에 viable cell count하여 이 결과를 당시 발효액내의 ethanol 농도를 해서 나타낸 결과는 figure 12와 같았다. 이 그림에서 알 수 있는 것은 같은 농도의 ethanol이 생산되었다 하더라도 당시 온도가 높으면 균의 생존율이 훨씬 낮다는 사실이다.

따라서 균의 생존은 ethanol의 농도, 당시의 발효온도 등 다방면의 요인이 작용하는 것임을 입증할 수 있었다. 즉 발효온도 고온에서 발효 ethanol의 최종농도가 낮은 이유는 당시에 생존하는 균이 없다는, 다시 말해서 생

리적으로 활성이 유지되는 균이 존재하지 않기 때문이다. 이상 *Zymomonas mobilis* ZM4 균주를 사용하여 Ethanol 발효 Kinetic Parameter를 구하여서 그 특유의 성질을 검토하여 발효조건중 중요한 발효온도등을 살펴보았다. 이 결과를 토대로 Ethanol의 生産性を 올릴수 있는 발효방법을 고안 실험하기로 하였다.

N. *Zymomonas mobilis*를 이용한 高生産性 Ethanol 醱酵

1. 菌体回收 連續培養

*Zymomonas*의 가장 두드러진 특성은 Figure 8에서 이미 보여준 것같이 比Ethanol生成速度와 比増殖速度가 不合一되는 사실이다. 이는 곧 菌体를 再使用하면 Ethanol생산이 가능하다는 뜻이 된다. *Zymomonas*는 세균으로서 그 크기가 1.0~5.0 μ 으로 아주 적고 또 운동성이 강하므로 이 균체를 회수하여 再使用하고자 Figure13과 같이 Tangential Flow Microfiltration을 사용하였다.

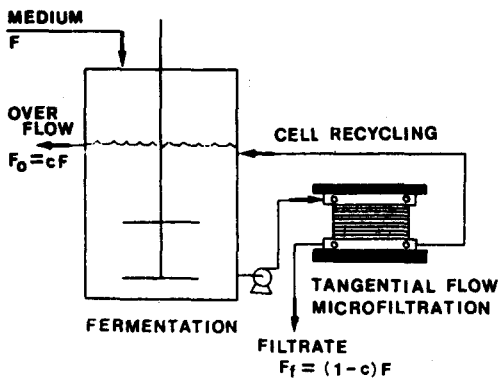


Figure 13. Schematic Diagram of Continuous Cell Recycle System.

Tangential flow microfiltration은 미세한 물질을 액체로부터 분리하기 위해 Pore size 0.2~0.5 μ 의 membrane을 사용할 때 그 효율을 증진시키기 위해 원액을 membrane에 接線이 되도록 빠른속도로 흐르게한 것이다. 이 방법은 membrane여과시에 흔히 보는 filtrate flow rate의 감소현상이 크게 해소된다.

먼저 glucose 100g/l의 배지를 사용하여 回醱後 biomass 3g/l의 농도에서 연속배양을 시작하며 균체를 계속 回收하는 소위 cell recycled continuous culture를 한 결과는 figure14와 같았다. 최초에 균체량이 낮을 때는 dilution rate를 낮게하고 차츰 균체량이 증가함에 따라 dilution rate을 증가시켰는데 균체량이 40g/l되었을 때는 dilution rate를 2.0 h⁻¹까지 가능하였다. 이때 주어진 glucose가 完全히 ethanol로 발효 전환되었음을 알 수 있다. 먼저 figure 5에서 이미본 것같이 통상의 연속배양에서는 균체량이 2.5 g/l 정도로 최적 dilution rate가 0.3 h⁻¹였으며 이때 ethanol생산성 (Productivity)가 15g/l/h였는데 균체를 recycle시켜 continuous culture한 결과 dilution rate를 2.0 h⁻¹까지 증가됨과 동시에 ethanol생산성도 100g/l/h까지 상승시킬 수 있음을 알수있다.

좀더 높은 ethanol생산성을 얻기위하여 사용배지의 glucose농도를 120g/l로 증가시킨 결과는 figure 15와 같았다. 100g/l의 glucose배지를 사용하였을 때와 마찬가지로 120g/l의 glucose가 完全히 발효되어 60g/l의 ethanol농도로 ethanol생산성이 200g/l/h되었음을 알 수 있었다.

membrane을 사용하여 cell을 recycle할때 가장 문제가 되는 것은 membrane의 filter rate가 경시적으로 감소되는 현상이다. Tangential flow microfiltration은 일반 cross-filter batch형 보다 비교할 필요없이 효율

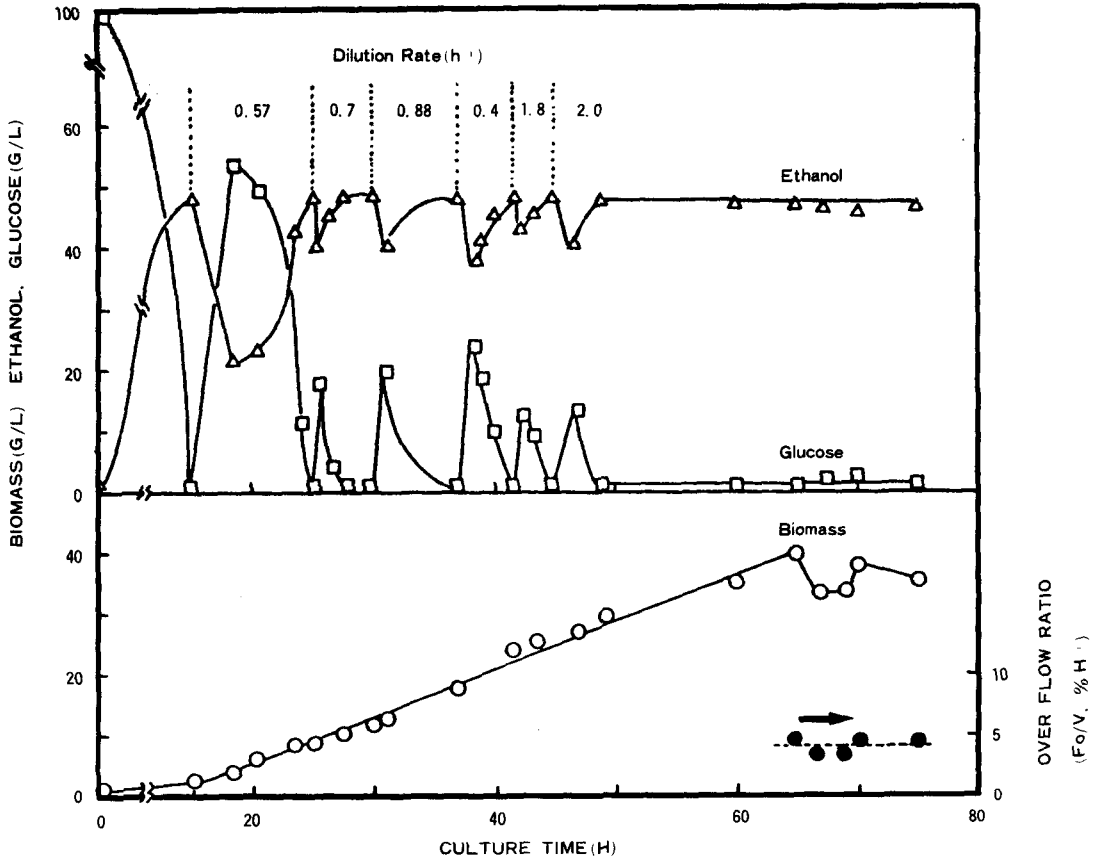


Figure 14. Effect of step increases in dilution rate from batch culture to $D=2.0h$ on characteristics of continuous cell recycle system with *Z. mobilis* ZM1 using 100 g/l glucose medium (Temp=30°C, pH=5.0).

이 증가되기는 하였으나 연속으로 수일간 사용하기에는 미흡하다.

Figure 14 및 15에서 필히 공통된 사실은 본 external cell feed-back이 완전히 모든균체의 회수가 가능하므로 발효조내의 균체량이 계속 증가되는 것이다. 따라서 설치된 membrane의 filter 능력에 한계가 있으므로 어느 일정한 수준으로 균체를 배출시켜야 한다. 이때 균체의 배설율은 그때 발효액의 ethanol농도에 의해서 결정되는 균의 比増植速度와 一致하여 대략 5~6%에 달한다.

당의 농도를 더 높이면 ethanol의 농도가 증가되어 얻는 장점이 많겠으나 당농도 50g/l 을 사용하면 ethanol농도가 70~72g/l 되는데 5~6시간의 연속배양이 가능하나 그 이상을 지속시키면 균의 생존율이 떨어져 결국 오래 연속배양을 할수가 없었다.

2. *Zymomonas* 菌株의 改良

前述한대로 ethanol농도를 75g/l 이상높여 서는 장시간 연속배양이 어려운 것은 菌의 生

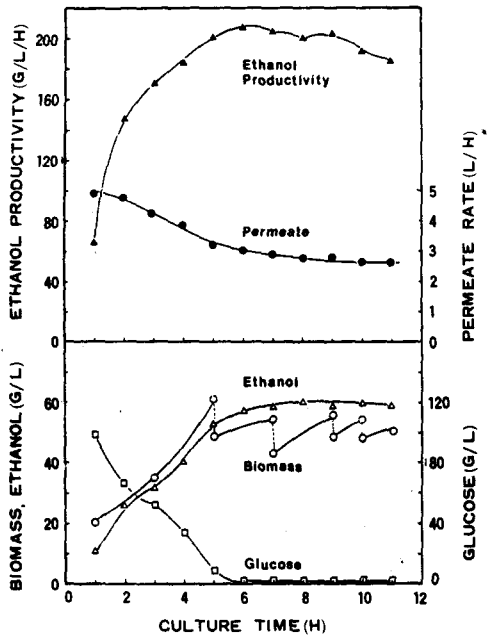


Figure 15. Production of ethanol by *Z. mobilis* ZM 4 on 120 g/l glucose medium. (Dotted line indicates controlled overflow of biomass).

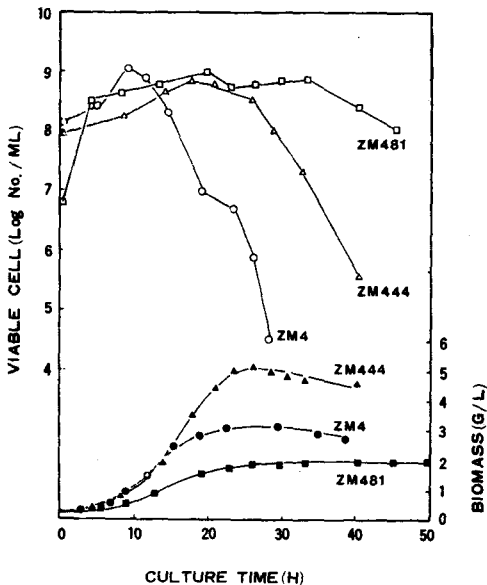


Figure 16. Comparative studies of biomass production and viable cell count strains of *Z. mobilis* on 300 g/l glucose medium (pH=5.0, T=30°C)

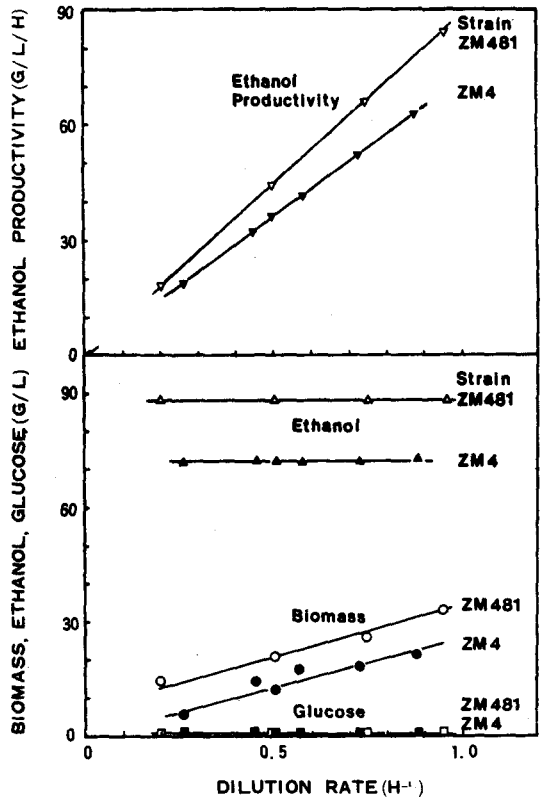


Figure 17. Comparative studies with *Z. mobilis* ZM 4 and ZM481 in continuous cell recycle system. (150 g/l glucose medium was used for ZM 4 and 180 g/l glucose medium was used for ZM481)

存能力이 떨어지기 때문이다.

따라서 母菌인 ZM 4를 變異시켜 고농도의 ethanol에서 母菌보다 生存能力이 우수한 균주를 얻었다. Figure 16에 나타난것 같이 母菌보다 생존율이 좋은 菌株로서 ZM 444와 ZM 481을 얻었으나 ZM 444는 ZM 481이 더 우수한 생존능력을 가졌고 또한 균체량이 모균보다 낮은 것이 특징이었다.

ZM 481균주를 cell-recycled continuous culture한 결과 figure 17에서 보는 바와 같이 모균의 경우 장기간 연속배양이 가능한 최고의 ethanol 농도가 70~72g/l 인데 비해 변이

주 ZM 481은 88~89g/l의 ethanol 농도를 유지하면서 모균보다 더 높은 ethanol 생산성을 얻을 수가 있었다.

V. *Zymomonas*와 Yeast와의 比較

이상 *Zymomonas*속 세균의 미생물학적 특성을 고찰하고 회분 연속발효를 통해 kinetic parameters를 구하였으며 이를 근거로해서 C-el.-recycled continuous culture system을 이용 고생산성 ethanol 발효를 이룩하였다.

그러면 종래에 사용해진 yeast균과의 차이점을 비교해서 그 장단점을 검토하고자 한다.

먼저 발효 kinetic parameters를 비교하면 table 7와 같다. 즉 *Zymomonas*가 yeast보다 ethanol 발효에 유리한 성질로서는

- (1) ethanol yield가 높고 biomass yield가 낮다.
- (2) 比 ethanol 생산속도(q_p)가 yeast보다 4~5배 빠르다.
- (3) ethanol glucose 농도가 높을 때에도 菌의 比增植速度가 빠르다.
- (4) 高濃度の 菌體를 이용하였을 때 산소공급체재를 조절할 필요가 없다.
- (5) Ethanol 농도가 증가하여도 比 ethanol 생산속도가 떨어지지 않는다 (ethanol 농도 70g/l 이하까지)
- (6) Prokaryotic cell이므로 yeast cell보다

Table 7. Comparisons of the kinetic parameters of *Z. mobilis* and Yeast for ethanol fermentation.

Micro-organism	Culture system	Glucose input (g/l)	Kinetic parameters at optimal condition					Reference
			μ (h^{-1})	q_p (g/g/h)	q_s (g/g/h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	
S. cerevisiae ATCC 4126	Continuous culture	100	0.17	0.58	1.41	0.12	0.41	Cyeewski and Wilke (1976, 1977)
		89	0.19	0.60	1.39	0.13	0.43	
S. cerevisiae NRRL Y-132	Continuous culture	100	0.12	0.61	1.38	0.08	0.44	Ghose and Tyagi (1979)
		220	0.12	0.62	1.32	0.09	-	
S. uvarum ATCC 26602	Batch	250	0.23	1.15	3.02	-	0.38	Lee J. H. et al (1980)
Z. mobilis ATCC 10988 (ZM1)	Batch	100	0.21	2.50	5.47	0.038	0.49	This work
		250	0.13	2.53	5.45	0.019	0.47	
	Continuous culture	100	0.20	3.2	6.4	0.029	0.50	
		150	0.235	3.8	7.6	0.027	0.50	
Z. mobilis (ZM 4)	Batch	100	0.35	5.2	10.9	0.032	0.48	This work
		250	0.18	5.4	11.3	0.015	0.48	
	Continuous	100	0.38	5.4	10.8	0.037	0.50	
		135	0.28	5.4	10.8	0.025	0.50	
		170	0.24	5.1	10.5	0.022	0.48	

Table 8. Comparison of ethanol productivities achieved in various culture system with *Z. mobilis* and strains of yeast on glucose medium.

System used	Micro-organism	Glucose input (g/l)	Conc ⁿ of ethanol (g/l)	Ethanol productivity (g/l/h)	Reference
Batch	<i>Z. mobilis</i>	250	119	5.9	This work del Rosario <i>et al</i> (1979)
	<i>S. uvarum</i>	250	109	2.7	
Continuous	<i>Z. mobilis</i>	170	60.0	12.5	This work Cysewski & Wilke (1976)
	<i>S. cerevisiae</i>	100	41.0	7.0	
Recycle	<i>Z. mobilis</i>	140	70.0	120-200	This work This work Ghose & Tyagi (1980) del Rosario <i>et al</i> (1979)
	<i>Z. mobilis</i>	200	98.0	93.0	
	<i>S. cerevisiae</i>	150	60.5	32.0	
	<i>S. uvarum</i>	200	60.0	36.0	
Vacuum with cell recycle	<i>Z. mobilis</i>	200	180.0*	85	Lee J. H. <i>et al</i> (1981) Cysewski & W Wilke (1977)
	<i>S. cerevisiae</i>	334	160.0*	82	

* Ethanol concentration in vapour stream from vacuum fermentor.

는 gene manipulation에 의해서 우수균주의 취득이 가능하고 또한 cloning technique을 이용하여 基質의 영역을 확대하는데 yeast을 사용하는 것 보다는 수월할 것이다.

이상과 같은 장점을 이용하여 ethanol 발효를 하였을 때 그 ethanol 생산성을 발효 System별로 양균을 비교한 결과 Table 8과 같다. 회분발효에서부터 cell recycle 또는 vacuum 발효에 이르기까지 ethanol 생산성 훨씬 뛰어났고 특히 cell recycle시켰을 때는 그 생산성이 4~8배 이상으로 ethanol을 생산해 낼 수 있었다. *Zymomonas*로 얻은 ethanol 생산성은 yeast을 사용해서는 도저히 얻을 수 없는 높은 생산성이었다.

VI. 結論 및 將來性

이상 비교검토한 것과 같이 *Zymomonas*는 yeast와 다른 양식으로 ethanol阻害를 받으며 그 比 ethanol생산속도가 높은 특성으로 인해서 종래에 사용했던 yeast보다는 더 우수한 균으로 판명되었다. 이러한 結論은 연료용 ethanol생산을 위해 均제회수식 연속배양을 하였을 때 가능한 것이다.

물론 回分發酵時에도 yeast보다는 고농도의 당을 짧은 시간에 발효시켜 더 높은 농도로 ethanol을 얻을 수 있다. 回分發酵에서 yeast보다 발효초기에 均제량이 적을 경우 전체적인 발효속도가 느리나 발효후반기에는 ethanol

이저해를 받지 않고 전체적인 발효속도가 아주 빠른것이 특징이다.

균체회수식을 위해서는 좀더 경제적이고 지속성이 있는 균체회수장치의 개발이 필요하다 하겠다. 그러나 응집력이 강한 균주의 개발이 가능하기 때문에 회분발효후 진탕을 정지시킨 균체를 下降시켜 상등액만을 쓰고 다시 새 배지를 넣는 이른바 semi-batch culture system이 우선적으로 산업적 이용성이 높다 하겠다.

현재 *Zymomonas*에 대한 연구의 초점은 Protoplast fusion 또는 cloning technique로서 *amylase* 또는 *cellulase gene*을 *Zymomonas*에 부여하고자 하는 것이다.

우리나라 같이 酒精을 생산 회석식 소주를 생산하는데 있어 *Zymomonas*는 yeast보다 高級 alcohol 생성하는 경향이 아주 낮고 ethanol 수율이 높으므로 *Zymomonas*를 사용하여 酒精 생산을 시도할 가치가 있다고 판단된다.

좀더 연구지원이 가능하면 starch를 직접 발효할 수 있는 균주의 개발을 목적하는 것이 필요하 할 것이다.

마지막으로 본 필자의 과거 수년간 *Zymomonas*에 관한 연구논문목록을 게재하며 본 논문을 맺고저 한다.

参考文献

- Bacila, M. and J. Horii(1979) : Trends in Biochem sci 4, 59-61.
- Barker, B.T.P. (1948) : Ann Rep. Agric. Hort. Res. stn. P174-181.
- Belaich, J.P., A. Belaich(1972) : J. Gen. Microbiol. 70, 179-185
- Carr, J. G and S. M. Passmole(1971) : J. Inst. Brew. 77, 462-466.
- Cysewski, G. R. and C. R. Wilke(1976) : Biotech. Bioeng. 18, 1297-1313
- Cysewski, G. R. and C. R. Wilke(1977) : Bi-

otech. Bioeng 19, 1125-1143

- Del Rosario, E. J., K. J. Lee and P. L. Rogers(1979) Biotech. Bioeng 21, 1477-1482.
- Ghose, T. K. and R. D. Tyagi(1979a) : Biotech. Bioeng 21, 1387-1400
- Hough, T. S. and A. M. Button(1972) : Prog. in Indust Microbiol 11, 89-132
- Lee, J. H., J. C. Woodard, P. L. Rogers(1981) : Biotech. Letters 3, 177-182
- Lindner, P. (1928) : Z. Ver Dsch Zuckerind 81, 25-36
- Linko, Y. and P. Linko(1981) : Biot. Letters 3, 2-26 21
- McGill, D. J. and D. W. Ribbons(1965) : Biochem. J. 97, 44-45
- Millis, N. F. (1956) : J. Gen. Microbiol. 15, 521-528
- Nagodawithana(1976) : Appl. Env. Microbiol. 3, 158-162
- Navbrro, J. M, and G. Durrand. (1978) : Ann Microbiol 128B 215-224
- Swings, J. and J. DeLey(1977) : Bact. Review 41, 1-46
- Tyagi R. D. and T. K. Ghose(1980) : Botech. Bioeng, 22, 1907-1928

Zymomonas 研究論文 目錄

1. Del Rosario, E. J., Lee, K. J. and Rogers, P. L. (1979) : Kinetics of Alcohol Fermentation at High Yeast Levels. Biotech. Bioeng., 21, 1477-1482.
2. Rogers, P. L., Lee, K. J. & Tribe, D. E. (1979) : Kinetics of Production by *Zymomonas mobilis* at High Sugar Concentration. Biotechnol. Letters. 1, 165-170.

3. Lee, K. J., Tribe, D. E. & Rogers, P. L. (1979) : Ethanol Production by *Zymomonas mobilis* in Continuous Culture at High Glucose Concentrations. *Biotechnol Letters*, 1, 421-426.
4. Rogers, P. L., Lee, K. J. & Tribe, D. E. (1980) : High Productivity Ethanol Fermentations with *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem.*, 15(6), 7-11.
5. Lee, K. J., Skotnicki, M. L., Tribe, D. E. & Rogers, P. L. (1980) : Kinetic Studies on a Highly Productive Strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Letters*, 2, 339-344.
6. Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnicki, M. L. & Tribe, D. E. (1980) : Ethanol Fermentation with Strains of *Zymomonas mobilis*. in "Symposium on Bioconversion and Biochemical Engineering." New Delhi. (Ed. Chose, T. K.), Vol 2, 359-369.
7. Grote, W., Lee, K. J. & Rogers, P. L. (1980) : Continuous Ethanol Production by Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Letters*, 2, 481-486.
8. Lee, K. J., Lefebvre, M., Tribe, D. E. & Rogers, P. L. (1980) : High Productivity Ethanol Fermentations with *Zymomonas mobilis* using Continuous Cell Recycle. *Biotechnol. Letters*, 2, 487-492.
9. Skotnicki, M. L., Lee, K. J.: Production by different *Zymomonas* Strains. *Appl. & Env. Microbiol.*, 41, 889-893.
10. Lee, K. J., Skotnicki, M. L., Tribe, D. E. & Rogers, P. L. (1981) : The Effect of Temperature on the Kinetics of Ethanol Production by Strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotech. Letters*. 3 (6), 291-296.
11. Lee, K. J., Skotnicki, M. L., Tribe, D. E. & Rogers, P. L. (1981) : The Kinetics of Fructose and Sucrose Utilization by *Zymomonas mobilis*. *Biotech. Letters*, 3 (5), 207-212.
12. Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnicki, M. L., and Tribe, D. E. (1981) : Ethanol Production by Highly Productive Strains of *Zymomonas mobilis*. in "Advances in Biotechnology", Pergamon Press (Eds. Moo-Young, M., and Robinson, C. W.,). Vol. 2, 189-194.
13. Skotnicki, M. L., Lee, K. J., Tribe, D. E. and Rogers, P. L. (1981) : Genetic Alteration of *Zymomonas mobilis* for Ethanol Production. in "Genetic Engineering of microorganisms for Chemicals" Plenum Publishing Corp., New York. (Ed. Hollaender, A.), 271-290.
14. Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnicki, M. L. and Tribe, D. E. (1981) : Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. in "Advances in Biochemical Engineering", Springer-Verlag. (Ed. Fiechter, A.) (in press).
15. Lee, K. J. (1982) : High Productivity Fermentation for Ethanol Production. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 10(1), 59-68.